



IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ESSENCIAIS NA UTILIZAÇÃO DE CELULOSE EM *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Palavras-Chave: *Aspergillus fumigatus*, fatores de transcrição, CAZymes

Autores(as):

Julia Caldeira Santos, IB - UNICAMP

Prof. Dr. André Ricardo de Lima Damásio (orientador), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal apresenta uma complexa composição, a qual tem como principal componente polissacarídico a celulose.

Com isso, o gênero *Aspergillus* é formado por uma classe de fungos filamentosos essencialmente saprofiticos, os quais são importantes modelos devido suas altas produção e secreção de enzimas e seu papel na reciclagem de carbono, principalmente. Dentre os integrantes desse grupo, pode-se destacar a espécie *Aspergillus fumigatus*. Embora seja um organismo patogênico oportunista, o qual pode dar origem a aspergilose caso haja a inalação de seus conídios por indivíduos imunocomprometidos (LATGÉ, 1999), o fungo *A. fumigatus* apresenta importância biotecnológica por ser um organismo capaz de produção de uma diversidade de enzimas lignocelulolíticas (DE GOUVÊA et al., 2018).

A fim de haver a degradação de compostos, como a celulose, em monômeros, é utilizado principalmente enzimas classificadas em famílias no banco de dados Carbohydrate-Active enZymes (CAZy), ou, CAZymes. Essas enzimas são responsáveis por participarem da síntese e metabolismo de carboidratos. Ao haver a detecção de, provavelmente, mono e dissacarídeos no ambiente, o fungo realiza sinalizações que induzem a expressão de genes específicos de CAZymes principalmente, assim, a depender da concentração de açúcares no ambiente, há um ajuste da regulação gênica mediada por fatores de transcrição que modulam a expressão de determinados genes (BENOCCI et al., 2017).

O conhecimento desta rede de regulação é de vital importância para o desenvolvimento de melhores coquetéis enzimáticos para a bioprodução. Sendo assim, o objetivo central deste projeto é identificar novos fatores de transcrição em *A. fumigatus* que regulam a utilização de celulose.

METODOLOGIA

Screening de fatores de transcrição utilizando a biblioteca de mutantes de *A. fumigatus*

Uma coleção de mutantes de *A. fumigatus* será utilizada para o rastreamento de fatores de transcrição. Essa coleção apresenta mutantes com deleções únicas para cada fator de transcrição identificado no genoma do fungo. Essa coleção foi viabilizada pelo projeto COFUN da University of Manchester, UK, e gentilmente cedida pelo Prof. Gustavo Goldman, da FCFRP-USP, com aproximadamente 400 mutantes individuais de fatores de transcrição.

Para seleção dos fatores de transcrição foi utilizado dados transcriptômicos disponíveis no banco de dados FungiDB (fungidb.org) (BASENKO et al., 2018). Assim, foi utilizado para este projeto os dados transcriptômicos disponíveis nesse banco de dados, em cultivos com lignocelulose ou celulose, e sem estas fontes:

- Resposta transcriptômica à celulose cristalina (Avicel) (CORADETTI; XIONG; GLASS, 2013)
- Resposta transcriptômica à lignocelulose (bagaço de cana) (BORIN et al., 2017)
- Resposta transcriptômica à lignocelulose (bagaço de cana) (DE GOUVÊA et al., 2018)

Tendo esses critérios em vista, foram identificados 24 mutantes (Tabela 1)

Tabela 1.

AFUB_000400	AFUB_045780	AFUB_074510
AFUB_008120	AFUB_046330	AFUB_084330
AFUB_010180	AFUB_047730	AFUB_086770
AFUB_022340	AFUB_048380	AFUB_088390
AFUB_022390	AFUB_053950	AFUB_096500
AFUB_026210	AFUB_056710	AFUB_097380
AFUB_036300	AFUB_057290	AFUB_098690
AFUB_038600	AFUB_067320	AFUB_101990

Cepas e condições de cultivo

Os organismos utilizados serão cepas de *Aspergillus fumigatus* A1163. Todas as cepas serão propagadas a 37°C em meio mínimo (1 X Clutterbucks salts (20 X Clutterbucks salts: 1,4 M NaNO₃, 0,13 M KCl, 0,042 M MgSO₄.7H₂O e 0,22 M KH₂PO₄ em 1000 mL), 1 X elementos traços (1000 X elementos traços: 7,2 mM ZnSO₄.7H₂O, 17,7 mM H₃BO₃, 2,52 mM MnCl₂.4H₂O, 2,72 mM FeSO₄.7H₂O, 0,95 mM CoCl₂.5H₂O, 0,7 mM CuSO₄.5H₂O, 0,21 mM Na₂MoO₄.4H₂O e 17,11 mM

EDTA em 1000 mL) pH 6.5. O meio será complementado com 1% Avicel e 200 mg/L higromicina quando apropriado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através desses dados, foi possível identificar que AFUB_008120 e AFUB_086770 atendiam às condições de resposta transcriptômica. Com isso, foi realizado a análise em substrato sintético derivado de para-Nitrofenol (pNP), atividade enzimática da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) para avaliar a atividade enzimática, obtendo os resultados das Figuras 1, 2 e 3.

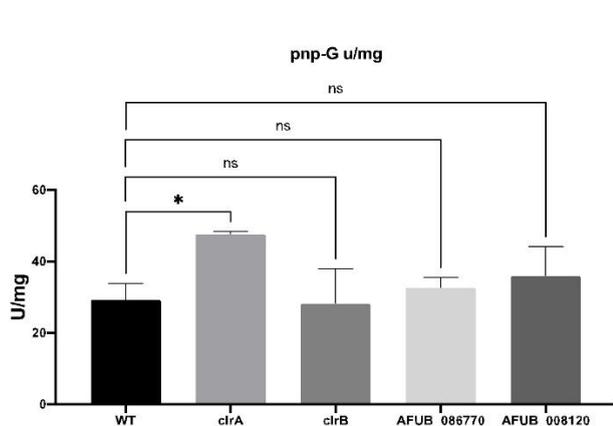


Figura 1: Atividade enzimática em miligramas em pNPG.

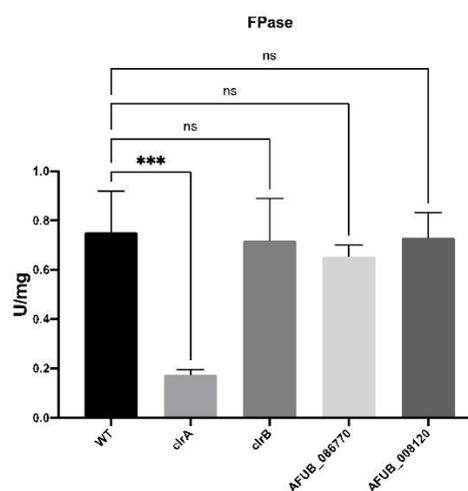


Figura 2: Atividade enzimática em miligramas em FPase

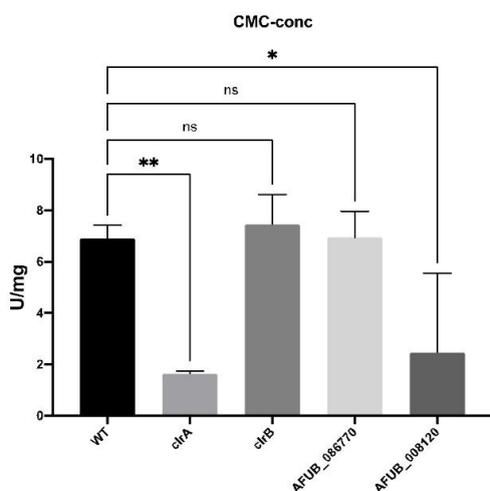


Figura 3: Atividade enzimática em miligramas em CMCase

Investigando a eficiência de bioprodução de celulase através da análise por para-Nitrofenol (pNP) e FPase, foi possível identificar que AFUB_008120 e AFUB_086770 apresentam características similares ao controle positivo ClrB. Entretanto, esse caráter muda quando observados os resultados obtidos para endoglucanase (CMCase), os quais demonstram que, embora AFUB_008120 apresenta atividade enzimática similar ao ClrB, AFUB_086770 apresenta essa atividade similar ao ClrA. Assim, é possível concluir que, comparados ao wild type (WT), as atividades enzimáticas em pNP e FPase apresentam diferença significativa apenas no mutante ClrA, o qual exibe menor atividade em ambos os testes, já em CMCase, é possível observar que tanto ClrA quanto AFUB_086770 apresentam diferença significativa.

BIBLIOGRAFIA

BASENKO, E. Y. et al. FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 1, 20 mar. 2018.

BENOCCI, T. et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 152, 12 dez. 2017.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 1 mar. 2013.

CERQUEIRA, G. C. et al. The Aspergillus Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D705-10, jan. 2014.

DE GOUVÊA, P. F. et al. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. **BMC Genomics**, 2018.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, dez. 2001.

LATCHMAN, D. S. Transcription factors: An overview. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 12, p. 1305–1312, 1997.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1999.

MEYER, V. et al. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 5, 2 dez. 2020.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

ROSALES-CALDERON, O.; ARANTES, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–58, 8 out. 2019.